



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

| | |
|---|----------------------------|
| In re Application of: Gunji et al. | |
| | Art Unit: 1635 |
| Application No.: 10/716,473 | Examiner: [to be assigned] |
| Filing Date: November 20, 2003 | Atty. Docket: US-104 |
| Title: Method for producing L-amino acid using methylotroph | |

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

| Country | Priority Document Appl. No. | Filing Date |
|---------|-----------------------------|-------------------|
| Japan | 2002-336346 | November 20, 2002 |

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,



Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: April 2, 2004
PTO Customer Number: **000038108**
Ajinomoto Corporate Services, LLC
1120 Connecticut Avenue
Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2002年11月20日

出願番号 Application Number: 特願2002-336346

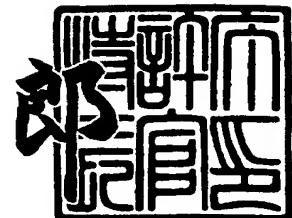
[ST. 10/C]: [JP2002-336346]

出願人 Applicant(s): 味の素株式会社

2003年 7月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

大田信一



【書類名】 特許願
【整理番号】 P-B0247
【提出日】 平成14年11月20日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12P 13/06
【発明の名称】 メチロトローフを用いたL-アミノ酸の製造法
【請求項の数】 5
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
【氏名】 郡司 義哉
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
【氏名】 安枝 寿
【特許出願人】
【識別番号】 000000066
【氏名又は名称】 味の素株式会社
【代理人】
【識別番号】 100089244
【弁理士】
【氏名又は名称】 遠山 勉
【選任した代理人】
【識別番号】 100090516
【弁理士】
【氏名又は名称】 松倉 秀実
【選任した代理人】
【識別番号】 100100549
【弁理士】
【氏名又は名称】 川口 嘉之
【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】**【予納台帳番号】** 012092**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メチロトローフを用いたL-アミノ酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、L-アミノ酸を培地中に生成蓄積させ、該培地よりL-アミノ酸を採取する、L-アミノ酸の製造法において、

前記微生物は、エントナー・ドウドロフ経路を有し、かつ、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性もしくは2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ活性、又はこれらの両方の活性が増強されるように改変されたメタノール資化性細菌であり、前記L-アミノ酸は、ピルビン酸を中間体とする生合成経路によって生成するL-アミノ酸から選ばれる、L-アミノ酸の製造法。

【請求項2】 前記メタノール資化性細菌はメチロフィラス属細菌である請求項1記載の方法。

【請求項3】 6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性又は2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ活性が、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ又は2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のこれらの遺伝子の発現が増強されるようにこれらの遺伝子の発現調節配列を改変することにより増強された、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 L-アミノ酸が、L-リジン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリンから選ばれる請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】 エントナー・ドウドロフ経路を有し、かつ、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性もしくは2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ活性、又はこれらの両方の活性が増強されるように改変されたメタノール資化性細菌であって、ピルビン酸を中間体とする生合成経路によって生成するL-アミノ酸を生産する能力を有する細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、L-アミノ酸の製造法及びそれに用いる細菌に関し、詳しくは、L-アミノ酸生産能が向上したメタン資化性細菌及びそれを用いたL-アミノ酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イロソイシン、L-バリン及びL-フェニルアラニン等のL-アミノ酸は、従来、主としてブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型細菌を用いた発酵法により製造されている（非特許文献1）。また、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属（特許文献1）、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、アエロバクター属、キャンディダ属（特許文献2）、エシェリヒア属（特許文献3）等の微生物も、L-アミノ酸の製造に用いられている。

【0003】

また、これらの微生物は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換えDNA技術によりL-アミノ酸の生合成酵素を増強することによって、L-アミノ酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

【0004】

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法によりL-アミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特許文献4）、プロタミノバクター属（特許文献5）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特許文献6）、ミクロサイクラス属（特許文献7）、メチロバチルス属（特許文献8）、バチルス属（特許文献9）などに属する微生物を用いる方法が知られている。また本発明者らはこれまで、人工変異による育種および組換えDNA技術を使って、メチロフィラス属細菌を用いたL-アミノ酸製造法の開発を行ってきた（特許文献10）。

【0005】

一方、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ（特許文献11）、フルクトース

ホスホトランスフェラーゼ（特許文献12）、エノラーゼ（特許文献13）等の解糖系酵素遺伝子を導入することによって、L-アミノ酸の生産能を増加させる技術も知られている。

【0006】

ところで、多くのメタノール資化性細菌は、メタノール発酵経路の一つとして、エントナー・ドウドロフ経路を有している。同経路は6-ホスホグルコン酸から2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸の反応を触媒する6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ（以下、「EDD」と略す）と2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸を開裂してグリセルアルデヒド-3-リン酸とピルビン酸を生成する酵素2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーーゼ（以下、「EDA」と略す）から成る。EDD及びEDAをコードする遺伝子は、エシェリヒア・コリ及びザイモモナス・モビリス等でクローニングされ、塩基配列が報告されている。エシェリヒア・コリのEDDをコードする遺伝子(edd)及びEDAをコードする遺伝子(eda)の塩基配列は、GenBank accession L20897として登録されている。また、ザイモモナス・モビリスのedaの塩基配列はGenBank accession X58364として、eddの塩基配列はGenBank accession M60615 M37982として、データベースに登録されている。

しかし、エントナー・ドウドロフ経路とL-アミノ酸生産性との関係は知られていない。

【0007】

【特許文献1】

米国特許第3,220,929号

【特許文献2】

米国特許第3,563,857号

【特許文献3】

特開平5-244970号

【特許文献4】

特開昭45-25273号公報

【特許文献5】

特公昭49-125590号公報

【特許文献6】

特開昭50-25790号公報

【特許文献7】

特開昭52-18886号公報

【特許文献8】

特開平4-91793号公報

【特許文献9】

特開平3-505284号公報

【特許文献10】

特願平11-368097号

【特許文献11】

国際公開パンフレット第01/02542号 (WO 01/02542 A1)

【特許文献12】

国際公開パンフレット第01/48146号 (WO 01/48146 A1)

【特許文献13】

国際公開パンフレット第01/02543号 (WO 01/02543 A1)

【非特許文献1】

アミノ酸発酵、学会出版センター、195~215頁、1986年

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来知られている技術と異なる観点から、細菌のL-アミノ酸生産性を向上させる技術を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、糖リン酸化合物からピルビン酸合成に至る代謝経路のうち、エントナー・ドウドロフ経路（以後、「ED経路」ともいう。）に着目した。グラム陰性の偏性メタノール資化性菌においてメタノールからL-リジン等のL-アミノ酸の合成原料となるピルビン酸に至る代謝経路の主なものは、エムデン・マ

イヤーホフ・パルナス経路（以後、「EMP経路」と略する場合がある）やエントナー・ドウドロフ経路であると考えられる。

まず、EMP経路を利用して、ピルビン酸の供給を増やすために、本発明者らは、ホスホフルクトキナーゼやホスホグリセレートキナーゼの酵素活性を増強することを当初実施したが、これらの酵素活性の増強に当たっては、該当する酵素の遺伝子が、目的とするメタノール資化性細菌の細胞へ導入できなかったり、あるいは、導入しても最終生産物であるL-リジンの生産量に影響が無かった。

そのため、ED経路上の代謝産物の流れを強化すべく検討した。

【0010】

ED経路を通して、ピルビン酸の供給を増やすためには、①6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ等の遺伝子を欠損又は弱化させる、あるいは②エントナー・ドウドロフ経路を強化する、という2つの方法が考えられる。両者ともに、同じくピルビン酸供給量の向上を期待できるが、②の場合、活性の強弱を調節することで、ピルビン酸供給経路とリブロースモノリン酸経路の代謝のバランスをとることができ、リブロースモノリン酸経路の中間物質であるリブロース5リシン酸や中間体の誘導体である核酸等の供給も可能であると考えられた。そして、種々検討を行った結果、エントナー・ドウドロフ経路を強化することによって、メタノール資化性菌のL-アミノ酸生産能を向上させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0011】

(1) L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、L-アミノ酸を培地中に生成蓄積させ、該培地よりL-アミノ酸を採取する、L-アミノ酸の製造法において、

前記微生物は、エントナー・ドウドロフ経路を有し、かつ、6-ホスホグルコン酸デヒドロターゼ活性もしくは2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーーゼ活性、又はこれらの両方の活性が増強されたメタノール資化性細菌であり、前記L-アミノ酸は、ピルビン酸を中間体とする生合成経路によって生成するL-アミノ酸から選ばれる、L-アミノ酸の製造法。

(2) 前記細菌はメチロフィラス属細菌である(1)の方法。

(3) 6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性又は2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーーゼ活性が、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ又は2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のこれらの遺伝子の発現が増強されるようにこれらの遺伝子の発現調節配列を改変することにより増強された、(1)又は(2)の方法。

(4) L-アミノ酸が、L-リジン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリンから選ばれる(1)～(3)のいずれかの方法。

(5) エントナー・ドウドロフ経路を有し、かつ、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性もしくは2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーーゼ活性、又はこれらの両方の活性が増強されるように改変されたメタノール資化性細菌であって、ピルビン酸を中間体とする生合成経路によって生成するL-アミノ酸を生産する能力を有する細菌。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

<1>本発明の細菌

本発明において用いられるメタノール資化性細菌は、L-アミノ酸を生産する能力を有し、かつ、エントナー・ドウドロフ経路を有するメタノール資化性細菌である。

【0014】

本発明において、「L-アミノ酸を生産する能力」とは、本発明の細菌を培養したときに、培地中にL-アミノ酸を蓄積する能力をいう。このL-アミノ酸生産能は、メタノール資化性細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。本発明を適用するとのできるL-アミノ酸としては、ピルビン酸を中間体とする生合成経路によつて生成するL-アミノ酸であり、具体的には、L-リジン、L-グルタミン酸、

L-スレオニン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-セリン、L-アラニン、L-チロシン、及びL-フェニルアラニン等が挙げられる。

【0015】

後述の実施例に示すように、EDD活性及びEDA活性を増強することによりエントナー・ドウドロフ経路を強化された細菌は、L-バリン生成が増大した。L-バリンはピルビン酸から生成するので、L-バリンの生成が増大したことは、ピルビン酸の供給量が増大したことを見ている。したがって、エントナー・ドウドロフ経路を強化された細菌は、ピルビン酸を中間体とする生合成経路によって生成するL-アミノ酸の生産能が上昇すると予想される。

【0016】

エントナー・ドウドロフ経路を有するメタノール資化性細菌として具体的には、メチロフィラス属、メチロバチラス属に属する細菌等が挙げられる。細菌がエントナー・ドウドロフ経路を有するか否かは、例えば、菌体破碎液をグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ及び6-ホスホグルコン酸と混合し、6-ホスホグルコン酸を基質として生成するグリセルアルデヒド-3-リン酸を検出することによって決定することができる。グリセルアルデヒド-3-リン酸の生成が確認された細菌は、エントナー・ドウドロフ経路を有する。

【0017】

本発明においてメタノール資化性菌、即ち、メチロトローフとは、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であって、EDD活性及び/又はEDA活性が増強するように改変されることによって、L-アミノ酸生産能が増強又は付与され得る細菌である。具体的には、メチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) 等のメチロフィラス属細菌、及び、メチロバチラス・グリコゲネス (*Methylobacillus glycogenes*)、メチロバチラス・フラゲラタム (*Methylobacillus flagellatum*) 等のメチロバチラス属細菌が挙げられる。

【0018】

メチロフィラス属細菌としては具体的にはメチロフィラス・メチロトロファス AS1株 (NCIMB10515) があげられる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株は

ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。

【0019】

また、メチロバチラス・グリコゲネスとしては、T-11株 (NCIMB 11375) 、ATCC 21276株、 ATCC 21371株、ATR80株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994) 、42巻, p67-72に記載) 、A513株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994) 、42巻, p67-72に記載) 等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネスNCIMB 11375株は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。また、メチロバチラス・フラゲラタムとしては、KT株 (Arch. Microbiol., (1988), 149巻、p441-446に記載) 等が挙げられる。

【0020】

本発明のメタノール資化性細菌は、L-アミノ酸を生産する能力を有し、かつ、上記のようなエントナー・ドウドロフ経路を有する細菌であって、EDD活性もしくはEDA活性、又はこれらの両方の活性が増強されたメタノール資化性細菌である。本発明の細菌は、好ましくはEDD活性及びEDA活性の両方が増強されたメタノール資化性細菌である。

【0021】

「EDD活性又はEDA活性が増強された」とは、細胞当たりのEDD活性又はEDA活性が、野生型のメタノール資化性細菌のそれよりも高くなったことをいう。例えば、細胞当たりのEDD又はEDA分子の数が増加した場合や、EDD又はEDA分子当たりのEDD又はEDAの比活性が上昇した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のメタノール資化性細菌とは、EDD活性又はEDA活性増強する操作が行われていないメタノール資化性細菌である。

【0022】

細菌の E D D 活性及び／又は E D A 活性の増強は、 E D D 及び／又は E D A をコードする遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、 E D D 及び／又は E D A をコードする遺伝子断片を、目的とする細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これを同細菌に導入して形質転換すればよい。 E D D 活性及び E D A 活性の両方を増強する場合は、 E D D をコードする遺伝子断片及び E D A をコードする遺伝子断片は、それぞれ別個に異なるベクターに搭載してもよいが、同じベクターに搭載することが好ましい。尚、 L-アミノ酸生産能を有する細菌に上記組換えDNAを導入してもよいが、野生型の細菌に上記組換えDNAを導入して形質転換株を得、その後当該形質転換株に L-アミノ酸生産能を付与してもよい。

【0023】

E D D をコードする遺伝子及び E D A をコードする遺伝子は、エントナー・ドウドロフ経路を有する細菌由来の遺伝子のいずれも使用することができる。具体的には、エシェリヒア属細菌由来の遺伝子が挙げられる。エシェリヒア・コリ由来の E D D をコードする遺伝子 (edd) 及び E D A をコードする遺伝子 (eda) は、オペロンを形成していることが報告されている (J. Bacteriol., 1992, Jul; 174(14): 4638-46)。以下、 E D D をコードする遺伝子を edd、 E D A をコードする遺伝子を eda と記す。また、ザイモモナス属細菌の遺伝子も報告されており、これらの遺伝子の配列に基づいて作製したプライマーを用いた P C R (PCR: polymerase chain reaction; White, T. J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照)、又は上記遺伝子の配列に基づいて作製したプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、 edd 及び eda 遺伝子を取得することができる。例えば、エシェリヒア・コリの edd 及び eda を含むオペロン断片は、後述のプライマー edd-F (配列番号 11) 及び edd-R (配列番号 12) を用いた PCR 法によって取得することができる。他の微生物の edd 及び eda も、同様にして取得され得る。前記ハイブリダイゼーションの条件としては、 1 × S S C 及び 0. 1 % S D S に相当する塩濃度で 60 ℃ で洗浄が行われる条件が挙げられる。

【0024】

染色体 DNA は、 DNA 供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法 (

H. Saito and K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97~98頁、培風館、1992年参照) 等により調製することができる。

【0025】

PCR法により増幅されたedd及び／又はeda遺伝子は、エシェリヒア・コリ等の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリに導入しておくと、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pMW219, pSTV28, pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pBR322, pACYC184等が挙げられる。

【0026】

上記のように調製した組換えDNAをメチロフィラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43. 197(1997)) が挙げられる。

【0027】

edd及び／又はeda遺伝子のコピー数を高めることは、これらの遺伝子を細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。細菌の染色体DNA上にedd及び／又はeda遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、edd及び／又はeda遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

【0028】

EDD活性及び／又はEDA活性の増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、染色体DNA上またはプラスミド上のedd及び／又はeda遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が強力なプロモーターとし

て知られている。また、国際公開W000/18935に開示されているように、edd及び／又はeda遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。これらのプロモーター置換または改変によりedd及び／又はeda遺伝子の発現が強化され、EDD活性及び／又はEDA活性が増強される。これら発現調節配列の改変は、edd及び／又はeda遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0029】

EDD活性及びEDA活性が増強されたことは、菌体破碎液を、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ及び6-ホスホグルコン酸と混合し、6-ホスホグルコン酸を基質として生成するグリセルアルデヒド-3-リン酸を測定することによって、確認することができる。この反応において、反応後に残存した6-ホスホグルコン酸を、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼを用いて定量するか、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ過剰存在化で生成するピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼを用いて定量することによって、EDA活性を測定することができる。尚、6-ホスホグルコン酸又はピルビン酸は、デヒドロゲナーゼ反応におけるNADHの増加により定量することができる。また、EDD活性は、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸を基質として生成するピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼを用いて検出することによって、測定することができる。

【0030】

<2>本発明のメタノール資化性細菌

本発明の細菌は、上記のようにしてEDD活性もしくはEDA活性又はこれらの両方の活性が増強されるように改変され、かつ、ピルビン酸を中間体とする合成経路によって生成するL-アミノ酸の生産能を有するメタノール資化性細菌である。前記L-アミノ酸としては、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-セリン、L-アラニン、L-チロシン、及びL-フェニルアラニン等が挙げられる。

【0031】

本発明の細菌は、L-アミノ酸生産能を有するメタノール資化性細菌のEDD

活性及び／又はEDA活性が増強するように改変することによって得られる。また、EDD活性及び／又はEDA活性が増強するように改変されたメチロフィラス属細菌に、L-アミノ酸生産能を付与することによっても、本発明のメタノール資化性細菌を得ることができる。また、本発明のメタノール資化性細菌は、EDD活性及び／又はEDA活性が増強するように改変されたことによってL-アミノ酸生産能が付与されたものであってもよい。

【0032】

L-アミノ酸生産能を有するメタノール資化性細菌は、メタノール資化性細菌の野生株にL-アミノ酸生産能を付与することにより取得され得る。L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-アミノ酸の生合成系酵素が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

【0033】

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、又はオキサリジン、リジンハイドロキサメート、S-（2-アミノエチル）-システィン、γ-メチルリジン、α-クロロカプロラクタム、DL-α-アミノ-ε-カプロラクタム、α-アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

【0034】

次に、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

【0035】

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メタノール資化性細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メタノール資化性属細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメタノール資化性細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

【0036】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メタノール資化性細菌中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli (エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)) K-12株及びメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) 等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapA, Richard, F. et al. J. Bacteriol., 297(1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (lysC, Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、E. coli由来のdapA及びlysCを例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

【0037】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。E. coli由来の野生型DDPSはL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、E. coli由来の野生型AKIIIはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、メタノール資化性細菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA」と呼ぶことがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するE. coli由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。

【0038】

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとL-リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

【0039】

E. coli由来の野生型dapAの塩基配列を配列番号13に、同塩基配列によってコードされる野生型DDPSのアミノ酸配列を配列番号14に例示する。

【0040】

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、配列番号14に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる。

【0041】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

【0042】

また、メタノール資化性細菌で機能するベクターとしては、例えばメタノール資化性細菌で自律複製出来るプラスミドが挙げられる。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) 、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990)) 、pRP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980)) 等が挙げられる。

【0043】

dapA及びlysCとメチロフィラス属メタノール資化性細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

【0044】

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている (W095/16042号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

【0045】

RSFD80に含まれている変異型dapAは、配列番号13に示す野生型dapAの塩基配列において塩基番号597のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型DDPSは、配列番号14に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有する。また、RSFD80に含まれている変異型lysCは、野生型lysCの塩基配列において塩基番号1638のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型AKIIIは、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有する。

【0046】

上記のように調製した組換えDNAをメタノール資化性細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43. 197(1997)）が挙げられる。

【0047】

DDPS活性及びAK活性の増強は、dapA及びlysCをメタノール資化性細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。メタノール資化性細菌の染色体DNA上にdapA及びlysCを多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び／又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及lysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及びAK活性が増幅される。

【0048】

目的遺伝子の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、目的遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、 lac プロモーター、 trp プロモーター、 trc プロモーター、 tac プロモーター、 ラムダファージの PR プロモーター、 PL プロモーター、 tet プロモーター、 amy E プロモーター、 spac プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、目的遺伝子の発現が強化されることによって目的遺伝子がコードする酵素活性が増幅される。発現調節配列の増強は、目的遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0049】

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色

体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

【0050】

DDPS及びAKの増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号）、アスパラギン酸アミントランスフェラーゼ（特公平6-102028号）、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。

【0051】

また、メタノール資化性菌としてメチロフィラス・メチロトロファス由来のアスパルトキナーゼ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素は、WO 00/61723に開示されている。

【0052】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（WO 95/23864参照）。

【0053】

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、他のL-アミノ酸についても同様に適用することができる。尚、本発明のメタノール資化性細菌は、L-アミノ酸生産能を有する限り、EDD活性及び／又はEDA活性

が増強するように改変されたこと以外は、野生型の形質であってもよい。

【0054】

また、L-アミノ酸の菌体外への排出に関与するタンパク質の活性を強化することによっても、L-アミノ酸生産能を向上させることができる。例えば、L-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質としては、lysE遺伝子によってコードされるLysEタンパク質が知られている。尚、本発明者らは、ブレビバクテリウム属細菌に由来する野生型lysE遺伝子は、メチロフィラス属細菌やメチロバチラス属細菌中では全く機能しないが、メチロトローフで機能するような改変が可能であることを確認している。このようなlysEタンパク質の改変体としては、後記実施例に示すlysE24が挙げられる。

【0055】

lysE遺伝子がコードするLysEタンパク質は、6個の疎水性ヘリックス領域を有している。それらの疎水性ヘリックス領域のいくつかは膜貫通領域であると推定される。また、N末端から3番目と4番目の疎水性ヘリックス領域の間の領域は親水性であり、ループ構造をとると推定される。この親水性領域を本願発明においてはループ領域と呼ぶ。ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型lysEの塩基配列及びLysEタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号7及び8に示す。同アミノ酸配列において、疎水性ヘリックス領域は、5~20、37~58、67~93、146~168、181~203、211~232に相当する。また、ループ領域は94~145に相当する。

【0056】

本発明者らは、lysE遺伝子はメタノール資化性菌においては致死的に働くが、ループ領域を持たない、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなるLysEタンパク質の改変体をコードするDNAは、メタノール資化性菌のL-リジン及び／又はL-アルギニンの細胞外への排出を促進することを見い出した。lysE24は、このような野生型LysEタンパク質が持つループ領域を持たない変異型LysEタンパク質、又は実質的に疎水性ヘリックスのみからなる変異型LysEタンパク質をコードする。

【0057】

上記のような変異型lysEとしては、少なくとも一つ又は二つ以上の疎水性ヘリックスを有し、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するものであれば特に制限されないが、具体的にはN末端から1番目～6番目の疎水性ヘリックスのすべてを有する変異型LySEをコードするDNAが挙げられる。より具体的には、N末端から1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードするDNAが挙げられる。前記lysE24は、このような1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする変異型lysEの一例である。lysE24遺伝子には、3番目の疎水性ヘリックスをコードする領域の下流に終止コドンが変異により導入されているが、この終止コドンよりも下流の領域を欠失させると、lysE24遺伝子を導入したメチロフィラス・メチロトロファスAS1株はL-リジンを培地中に蓄積しないことを、発明者らは確認している。このことから、1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドがそれぞれ別個に翻訳され、メタノール資化性細菌中で機能しているものと推定される。いずれにしても、lysE24遺伝子をメタノール資化性細菌に導入すれば、L-リジン又はL-アルギニンの生産量が向上する。

【0058】

前記のようなL-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質をコードするDNA、すなわちlysE遺伝子またはその相同遺伝子の供与微生物としては、それらの遺伝子の改変体がメタノール資化性菌中でL-リジン排出活性を発現することができるものを保持する微生物であれば、いかなる微生物でも利用できる。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等が挙げられる。

【0059】

メタノール資化性細菌においてアミノ酸の排出遺伝子を増強する場合は、その

遺伝子断片を、メタノール資化性細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して、組換えDNAを作製し、これをメタノール資化性細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。あるいは、トランスポゾンに搭載し、染色体への組み込みにより、また、メタノール資化性細菌内で強力転写を誘導するようなプロモーターを、その遺伝子の上流に連結させることも可能である。

【0060】

<3>L-アミノ酸の製造

上記のようにして得られるL-アミノ酸生産能を有するメタノール資化性細菌を培地に培養し、該培養物中に同L-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物から同L-アミノ酸を採取することにより、同L-アミノ酸を製造することができる。

【0061】

本発明で用いられる微生物は、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられる方法で培養することができる。本発明で用いられる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

【0062】

メタノールを主たる炭素源として用いると、L-リジン又はL-バリンを安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に0.001~30%添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

【0063】

培養は、振とう培養又は通気搅拌培養などの好気条件下、pH5~9、温度20~45°Cに保持して行われ、通常24~120時間で終了する。

培養物からのL-リジン又はL-バリンの採取は、通常イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0064】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

試薬は、特記しない限り和光純薬、又はナカライトスク社製のものを用いた。各実施例で用いる培地の組成は以下に示すとおりである。いずれの培地もpHはNaOHまたはHClで調整した。

【0065】

(LB培地)

| | |
|---------------------|-------|
| トリプトン・ペプトン (ディフコ社製) | 10g/L |
| 酵母エキス (ディフコ社製) | 5g/L |
| NaCl | 10g/L |
| pH7.0 | |

[120℃、20分間蒸気滅菌を行った。]

【0066】

(LB寒天培地)

LB培地

| | |
|----------------------|-------|
| バクトアガー | 15g/L |
| [120℃、20分間蒸気滅菌を行った。] | |

【0067】

(SEII培地)

| | |
|---|--------------|
| K ₂ HP0 ₄ | 1.9g/L |
| NaH ₂ P0 ₄ | 1.56g/L |
| MgS0 ₄ ·7H ₂ O | 0.2g/L |
| (NH ₄) ₂ S0 ₄ | 5g/L |
| CuS0 ₄ ·5H ₂ O | 5 μ g/L |
| MnS0 ₄ ·5H ₂ O | 25 μ g/L |
| ZnS0 ₄ ·7H ₂ O | 23 μ g/L |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 72mg/L |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 9.7mg/L |
| CaCO ₃ (関東化学製) | 30g/L |
| メタノール | 2% (vol/vol) |
| pH7.0 | |

[メタノール以外は121℃、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

【0068】

(SEII寒天培地)

| | |
|---|----------------|
| K ₂ HPO ₄ | 1.9g/L |
| NaH ₂ PO ₄ | 1.56g/L |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.2g/L |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5g/L |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 5 μg/L |
| MnSO ₄ · 5H ₂ O | 25 μg/L |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 23 μg/L |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 72mg/L |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 9.7mg/L |
| メタノール | 0.5% (vol/vol) |

pH7.0

バクトアガー(ディフコ社製) 15g/L

[メタノール以外は121℃、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

【実施例1】

【0069】

<1>エントナー・ドウドロフ経路を構成する酵素遺伝子のクローン化

エントナー・ドウドロフ経路を構成する酵素EDD及びEDAをそれぞれコードする遺伝子edd及びedaは、エシェリヒア・コリ、ザイモモナス・モビリス等よりクローン化されている。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株中でエシェリヒア・コリの遺伝子は発現可能であることが知られているので、エシェリヒア・コリのedd及びeda遺伝子をクローン化し、メチロフィラス属細菌中で発現させることとした。

(1) edd及びedaを保持するプラスミドpMW-EDDAの構築

【0070】

エシェリヒア・コリにおいては両遺伝子はオペロンを形成しており (J. Bacteriol., 1992, Jul;174(14):4638-46) 、すでに、公知の技術にて、それらを取得することが可能である。そこで、両遺伝子を同時に増幅できるプライマー、edd-F (配列番号11) 及びeda-R (配列番号12) を設計し、E.coli W3110株の染色体DNAを鑄型としPCRにより両遺伝子を含むDNA断片を増幅した。PCRは、宝酒造（株）製Pyrobest DNA Polymeraseを用い、94℃ 1分の反応の後、94℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 3分からなる反応を30サイクル行った。

【0071】

次に、得られた増幅断片を制限酵素SalI及びBamHIで完全分解し、プラスミドpMW219をSalI及びBamHIで完全分解したものと連結し、エシェリヒア・コリJM109（宝酒造（株）から購入）を形質転換した。得られた形質転換体コロニーを20mg/Lのカナマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、目的とするプラスミドを得た。このプラスミドをpMW-EDDAと命名した。

【0072】

(2) edd及びedaのメチロフィラス属細菌への導入用プラスミドpRSeddaの構築
メチロフィラス属細菌にedd及びedaを導入するために、公知のプラスミドpRSを用いて、edd及びeda導入用プラスミドpRSeddaを構築した。pRSはRSF1010の誘導体である広宿主型ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsyganko v, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) に由来するpVIC40プラスミド (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報) より、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドである。

【0073】

具体的には、pRSは以下のようにして構築した。pVIC40プラスミドをEcoRIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、ベクター側を含む約8キロベースペア（以下、「kbp」）

と記載) のDNA断片をEASY TRAP Ver.2 (DNA回収キット、宝酒造社製) を用いて回収した。このように調製したpVIC40プラスミドのベクター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて自己連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRSを得た。

【0074】

次に、このpRSより、 tacプロモーターを持つプラスミドpRStacを図1に示す方法で構築した。pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8キロベースペアのDNA断片をEASY TRAP Ver.2 (DNA回収キット、宝酒造社製) を用いて回収した。一方、 tacプロモーター領域を、 pRK223-3プラスミド (発現用ベクター、 Pharmacia社製) を鋳型とし、配列番号1および2に示すプライマーを用いて、 PCRにより増幅した (変性94℃-20秒、 アニーリング55℃-30秒、 伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った) 。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCRprep (Promega社製) にて精製した後、あらかじプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約0.15kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

【0075】

上記のように調製したpRSベクター消化物と、 tacプロモーター領域断片を、 DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。

寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRStacを得た。pRSベクター上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRStacとして選択した。pRStacプラスミドはpRS上に遺伝子を発現させる装置としてtacプロモーター領域を挿入したプラスミドである。

【0076】

続いて、上記のpRStacを、Sse8387I（宝酒造製）およびSapI（ニューイングランドバイオラボ社製）で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約8.0kbpのDNA断片を回収した。次に、（1）で構築したpMW-EDDAを制限酵素SalI及びBamHIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約2.9kbpのDNA断片を回収した。

【0077】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、edd及びeda遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（E.coli JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、目的とするプラスミドを得た。このプラスミドをpRSeddaと命名した。pRSeddaは、tacプロモーターの転写方向に対して、edd及びeda遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0078】

<2>メチロフィラス属細菌からのL-アーリジン生産菌構築

pRSeddaプラスミドのL-リジン生産に及ぼす影響を調べるために、メチロフィラス属細菌中で、pRS由来のベクターと共存可能で、L-リジン排出活性タンパク質およびDDPS酵素をコードする各遺伝子を増幅することが可能であるpBBR-1ysEdapAプラスミドを構築した。

【0079】

(1) pRSlysEの構築

コリネバクテリウム属細菌で知られているL-リジンの排出を促進する遺伝子の相同遺伝子であるlysE遺伝子をブレビバクテリウム属細菌よりクローニングし、メチロフィラス属細菌での発現を試みた。

【0080】

上記のようにして得たpRStacを、Sse8387I（宝酒造製）およびSapI（ニューアイランドバイオラボ社製）で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9.0kbpのDAN断片を回収した。

【0081】

また、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム2256株(ATCC13869)より抽出した染色体を鋳型として、配列番号5および6に示すプライマーを用いたPCR法（変性94°C-20秒、アニーリング55°C-30秒、伸長反応72°C-90秒）によりlysE遺伝子断片を増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。このとき、lysE遺伝子がメチロフィラス属細菌中で発現可能となるように、lysE遺伝子の翻訳開始コドンより9~15bp塩基を、メチロフィラス属細菌で機能することがわかっている配列(Wyborn, N. R., Mills, J., Willimas, S. G. and Jones, C.W., Eur.J.Biochem., 240, 314-322(1996))に変更するようにプライマーをデザインした。得られた断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびSapIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで回収した。

【0082】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、lysE遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシエリヒア・コリ（*E. coli* JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEを得た（図1）。pRSlysEは、tacプロモーターの転写方向に対して、lysE遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0083】

（2）メチロフィラス属細菌へのpRSlysEの導入

上記のようにして得られたpRSlysEを、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)）によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）に導入した。なお、対照として、pRSをpRSlysEと同様にしてAS1株に導入した。その結果、対照として用いたpRSでは1μgのDNAあたり数千個のコロニーを得たが、それに対してpRSlysEでは数個のコロニーしか得られなかった。

（2）メチロフィラス属細菌へのpRSlysEの導入

【0084】

pRSlysEが導入されたと思われる形質転換株よりプラスミドを抽出して塩基配列を調べたところ、調べたすべてのプラスミドにおいて、lysEをコードする領域内に自然変異が導入され、それらの変異のうちいくつかは、アミノ酸をコードするコドンが翻訳を停止させる停止コドンに置き換わるナンセンス変異が導入されていた。また、別のプラスミドではlysE遺伝子に欠失がみられた。これらのプラスミドに搭載されているlysEは、いずれも、機能が失われていると考えられた。

【0085】

以上のように、全長のlysE遺伝子を搭載するpRSlysEのメチロフィラス・メチロトロファスへの導入頻度は極めて低く、また機能を失わせるような変異が導入

されたlysE変異遺伝子を持つプラスミドのみが導入できたことと併せて考えると、メチロフィラス・メチロトロファスにlysE遺伝子を導入することは致死的であると考えられた。このことは、lysE遺伝子が異種の細菌においてL-リジンの排出に関して万能に機能するものではないことを示している。

【0086】

変異が導入されたpRSlysEを持つメチロフィラス・メチロトロファスAS1株を、50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、37℃にて1晩培養したのち、培地表面約10cm²の菌体をかきとて50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。その結果、変異型lysE遺伝子が導入されてもL-リジンの排出が促進されたと思われる株はほとんど得られなかった。

【0087】

(3) メチロフィラス属細菌でL-リジン排出活性を示す遺伝子の取得

前項で述べたように、既知のlysE遺伝子はメチロフィラス属細菌中では致死的であることが示唆され、機能が失われたような変異型遺伝子が多く得られた。

【0088】

しかしながら、大多数の変異が導入されたpRSlysEの解析を行ううちに、メチロフィラス属細菌中で機能する変異型lysE遺伝子を取得することができた。

【0089】

この変異型lysE遺伝子をlysE24遺伝子と命名した。lysE24遺伝子の塩基配列を解析したところ、この変異は、アミノ酸置換が起こる変異ではなく、lysEの翻訳領域内のはば中央に終止コドンが導入されるナンセンス変異であることがわかつた。

この変異型lysE遺伝子をlysE24遺伝子と命名した。lysE24遺伝子の塩基配列を解析したところ、この変異は、アミノ酸置換が起こる変異ではなく、lysEの翻訳領域内のはば中央に終止コドンが導入されるナンセンス変異であることがわかつた。

【0090】

lysE24の塩基配列を決定した結果を配列番号9に示す。対照としてブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型lysEの塩基配列及びLysEタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号7及び8に示す。lysE24では、配列番号7の355位のG（グアニン）のあとにT（チミン）が挿入されていた。このlysE24を持つプラスミドをpRSlysE24と命名した。

【0091】

lysE24の塩基配列を決定した結果を配列番号9に示す。対照として野生型のlysEの塩基配列を配列番号7に示した。lysE24では、配列番号7の355位のG（グアニン）のあとにT（チミン）が挿入されていた。このlysE24を持つプラスミドをpRSlysE24と命名した（図1）。

【0092】

pRSlysE24で形質転換されたE.coli JM109株はAJ13830と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18369として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8040の受託番号のもとで寄託されている。

lysE24遺伝子をメチロフィラス・メチロトロファスAS1株に導入することによって、培地中にL-リジンが蓄積することがわかった。これは、L-リジンの排出が促進されたことによると考えられた。

【0093】

(4) dapA*遺伝子を持つプラスミドpRSdapAの構築

L-リジン生合成系酵素遺伝子として、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子(dapA*)を持つプラスミドを作製した。

【0094】

pRStacをSse8387IおよびXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9kbpのDNA断片を回収した。

【0095】

dapA*遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミドRSFD80(WO90/16042号参照)を鑄型として、配列番号3および4に示すプライマーを用いたPCR法(変性94°C-20秒、アニーリング55°C-30秒、伸長反応72°C-60秒)により増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。得られたdapA*断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで分離後、約0.1kbpのDNA断片を回収した。

【0096】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、dapA*遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造製)を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ(E.coli JM109 competent cells、宝酒造社)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37°Cで一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37°Cで8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSdapAプラスミドを得た。pRSdapAプラスミドは、tacプロモーターの転写方向に対して、dapA*遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

(5) lysE24及びdapA*を持つプラスミドの構築

lysE24とdapA*の組み合わせ効果を評価するために、pRSlysEプラスミドにdapA*遺伝子を挿入したプラスミドを、図2に示した方法で構築した。(3)項で作製したpRSlysE24を制限酵素SapIで消化し、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)にて末端を平滑化した。また、前項で構築したpRSdapAを制限酵素EcoRIおよびSapIで消化し、0.8%アガロースゲルにより約1kbpのtacプロモーターおよびdapA*領域を含む断片を分離し、同断片をEASY TRAP Ver2(宝酒造製)にて回収した。この断片を前記と同様に平滑化し、前記のpRSlysE24の消化物とDNA Ligation Kit Ver2(宝酒造製)にて連結した。

【0097】

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造社製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEdapAプラスミドを得た。このプラスミドは、lysE24とdapA*の各遺伝子の転写の向きが同一になるように配置されている。

【0098】

pRSlysEdapAプラスミドで形質転換されたE.coli JM109株はAJ13832と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18371として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8042の受託番号のもとで寄託されている。

【0099】**(6) pRSベクターと共存可能なプラスミドpBBR-lysEdapAの構築**

次に、pRSlysEdapAからpBBR-lysEdapAを作成した。

pBBR1プラスミドはメチロフィラス・メチロトロファスAS1株中で複製可能であり、pRSベクターと共存することが可能であることが知られている (Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997); MoBiTec GmbH社 Lotzestrasse 22a 37083 Gottingen Germany、フナコシ株式会社から購入可能)。まず、pBBR1をDraIにて消化後、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約5.3kbpのDNA断片を回収した。

【0100】

次に、(5)項で構築したpRSlysEdapAプラスミドをEcoRIおよびBglIIにて消化後、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%ア

ガロースゲルで分離し、lysE24及びdapA遺伝子を含む約2.0kbpのDNA断片を回収した。

【0101】

このようにして得られたpBBR1ベクター消化物と、lysE24及びdapA遺伝子領域からなるDNA断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（*E.coli* JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのカナマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pBBR-lysEdapAを得た。

【0102】

上記のようにして得られたpBBR-lysEdapAプラスミドをエレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)）によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株に導入した。なお、対照として、pBBR1をpBBR-lysEdapAと同様にしてAS1株に導入した。

<3>エントナー・ドウドロフ経路強化株によるL-リジン生産

【0103】

上記のようにして得られたpBBR-lysEdapAプラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（AS1/pBBR-lysEdapAと略すことがある）に、pRSedd aプラスミドをエレクトロポレーション法により導入して、L-リジン生産能を評価することにした。

【0104】

得られた形質転換株（以下、「AS1/PBBR-lysEdapA/pRSedda」ともいう）、および対象としてpRSプラスミドを導入したメチロフィラス・メチロトロファスAS1/pBBR-lysEdapA株（以下、「AS1/pBBR-lysEdapA/pRS」ともいう）について、菌体内L-アミノ酸濃度および培養上清中のL-アミノ酸濃度を調べた。

【0105】

各形質転換株を50mg/Lのストレプトマイシンおよび50mg/Lのカナマイシンを含

むSEIIプレートで37℃にて1晩培養した後、培地表面約10cm²の菌体をかきとつて、50mg/Lのストレプトマイシンおよび50mg/Lのカナマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて48時間振とう培養した。培養終了後、培養液の一部を用いて菌体を遠心分離によって除去し、培養上清に含まれるL-アミノ酸濃度をアミノ酸分析計(日立分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。

【0106】

結果を表1に示した。AS1/pBBR-lysEdapA/pRSeddaでは、培地中においてAS1/pBBR-lysEdapA/pRSと比較して、より高濃度のL-リジンを培地中に蓄積し、edd及びeda遺伝子の強化によってL-リジンの生産性が向上していることがわかる。

【0107】

【表1】

表1

| 培養上清中のL-リジン濃度 | |
|---------------------------|-------|
| 菌株 | (g/L) |
| AS1/pBBR-lysEdapA/pRS | 1.15 |
| AS1/pBBR-lysEdapA/pRSedda | 1.35 |

【0108】

以上のように、エントナー・ドウドロフ経路を強化することによって、L-リジン生産能を向上させ得ることが示された。

<4>エントナー・ドウドロフ経路強化株によるL-バリン生産

【0109】

次に、野生株であるメチロイフィラス・メチロトロファスAS1株に、上記のようにして得られたpRSeddaを、エレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997))により導入した。なお、対照として、pRSを同様にしてAS1株に導入した。

【0110】

得られた形質転換株（以下、「AS1/pRSedda」ともいう）、および対象としてpRSプラスミドを導入したメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（以下、「AS1/pRS」ともいう）について、菌体内L-アミノ酸濃度および培養上清中のL-アミノ酸濃度を調べた。

【0111】

各形質転換株を50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートで37℃にて1晩培養した後、培地表面約10cm²の菌体をかきとて、50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて48時間振とう培養した。培養終了後、培養液の一部を用いて菌体を遠心分離によって除去し、培養上清に含まれるL-アミノ酸濃度をアミノ酸分析計で定量した。

【0112】

結果を表2に示した。AS1/pRSeddaでは、培地中においてAS1/pRSと比較して、より高濃度のL-バリンを培地中に蓄積し、edd及びeda遺伝子の強化によってL-バリンの生産性が向上していることがわかる。

【0113】

【表2】

表2

培養上清中のL-バリン濃度

| 菌株 | (g/L) |
|-------------|-------|
| AS1/pRS | 0.01 |
| AS1/pRSedda | 0.20 |

【0114】

以上のように、エントナー・ドゥドロフ経路を強化することによって、L-バリン生産能を向上させ得ることが示された。

【0115】

<5>エントナー・ドウドロフ経路強化株による他のL-アミノ酸の生産能の検討

AS1/pRSedda及びAS1/pRSを、50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートで37℃にて1晩培養した後、培地表面約10cm²の菌体をかきとて、50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて48時間振とう培養した。培養終了後、培養液の一部を用いて菌体を遠心分離によって除去し、培養上清に含まれるL-アミノ酸濃度をアミノ酸分析計で定量した。

【0116】

結果を表3に示した。いずれのL-アミノ酸についても、AS1/pRSeddaはAS1/pRSと比較してより高濃度のL-アミノ酸を培地中に蓄積し、edd及びeda遺伝子の強化によって各種L-アミノ酸の生産性が向上していることがわかる。<4>項で示したL-バリン以外には、特にL-ロイシン、L-イロソイシンに関して大幅に生産性が向上している。

【0117】

【表3】

表3

培養上清中のL-アミノ酸濃度 (mg/L)

| L-アミノ酸 | AS1/pRS | AS1/pRSedda |
|-----------|---------|-------------|
| L-アスパラギン酸 | 0 | 2 |
| L-スレオニン | 9.4 | 18.6 |
| L-セリン | 1.8 | 2 |
| L-グルタミン酸 | 35.9 | 46.8 |
| グリシン | 4.5 | 6.4 |
| L-アラニン | 16.7 | 37.9 |
| L-バリン | 10.2 | 202.3 |
| L-イソロイシン | 9.5 | 100.1 |

| | | |
|------------|------|------|
| L-ロイシン | 10.8 | 53.8 |
| L-チロシン | 8.4 | 9.7 |
| L-フェニルアラニン | 18.4 | 20.9 |
| L-リジン | 6.4 | 8 |
| L-アルギニン | 3.6 | 4 |

【0118】

以上のように、エントナー・ドウドロフ経路を強化することによって、各種L-アミノ酸生産能を向上させ得ることが示された。

【発明の効果】

本発明により、エントナー・ドウドロフ経路を有するメタノール資化性細菌のL-アミノ酸生産能を向上させることができる。

【0119】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co. Inc.

<120> メチロトローフを用いたL-アミノ酸の製造法

<130> P-B0247

<140>

<141> 2002-11-20

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

agggaattcc ccgttctgga taatgtttt tgcgccgac

39

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

cggatgcac tagagttAAC ctgcagggtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacac 58

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt

35

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat

36

<210> 5

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

catttcctgc aggcaaagga gatgagcgta atggtgatca tgaaaaatctt cattacagg 60
ctgc

64

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

| | |
|--|----|
| gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg aaaactaacc catcaacatc | 50 |
|--|----|

<210> 7

<211> 711

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(711)

<400> 7

| | |
|---|----|
| atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt | 48 |
|---|----|

| | |
|---|--|
| Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser | |
|---|--|

1

5

10

15

| | |
|---|----|
| ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga | 96 |
|---|----|

| | |
|---|--|
| Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly | |
|---|--|

20

25

30

| | |
|---|-----|
| att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct | 144 |
|---|-----|

| | |
|---|--|
| Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser | |
|---|--|

35

40

45

| | |
|---|-----|
| gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc | 192 |
|---|-----|

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
 50 55 60
 aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct 240
 Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac 288
 Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
 85 90 95
 aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc 336
 Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
 100 105 110
 gat gac acg cct ttg ggc ggt tcg gcg gtg gcc act gac acg cgc aac 384
 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn
 115 120 125
 cggtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag 432
 Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
 130 135 140
 ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat 480
 Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
 145 150 155 160
 ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac 528
 Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp
 165 170 175
 acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc 576
 Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile
 180 185 190
 tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca ttg tca cgc ccg ctg 624
 Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu
 195 200 205

tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg 672
 Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val
 210 215 220
 atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag 711
 Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
 225 230 235

<210> 8

<211> 236

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 8

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
 20 25 30

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
 35 40 45

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
 50 55 60

Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
 85 90 95

Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
 100 105 110

Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn

| | | |
|---|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
| Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly | | |
| 225 | 230 | 235 |

<210> 9

<211> 712

<212> DNA

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 9

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt 48

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| ctt ttg ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga | | | 96 |
| Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct | | | 144 |
| Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc | | | 192 |
| Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct | | | 240 |
| Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac | | | 288 |
| Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc | | | 336 |
| Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| gat gac acg cct ttg ggc gtg ttc ggc ggt ggc cac tga cacgcgcac | | | 385 |
| Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly His | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| cgggtgcggg tggaggtgag cgtcgataag cagcgggttt gggtaagcc catgttgatg | | | 445 |
| gcaatcgtgc tgacctgggtt gaaccgaaat gcgtatttgg acgcgttgtt gtttatcgcc | | | 505 |
| ggcgtcggcg cgcaatacgg cgacaccgga cggtggttt tcgcccgtgg cgcgttcgca | | | 565 |
| gcaaggctga tctggttccc gctgggtgggt ttcggcgcag cagcattgtc acgccccgt | | | 625 |
| tccagccccaa aggtgtggcg ctggatcaac gtcgtcgtgg cagttgtgat gaccgcattg | | | 685 |
| gccatcaaac tgatgtttag | | | 712 |

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 10

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly

20 25 30

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser

35 40 45

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser

50 55 60

Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala

65 70 75 80

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn

85 90 95

Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro

100 105 110

Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly His

115 120

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

cccccgggat ttccttcctc cggtctgctt

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

taaagcttgg tcagggcggtt ggccgggtggcg

30

<210> 13

<211> 1197

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1153)

<400> 13

ccaggcgact gtcttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60

caattccacg gcgatcgca cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgtatgacag 120

tgtcaaactg gttattcctt taaggggtga gttgttctta aggaaagcat aaaaaaaaaaca 180

tgcataacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgcttta atgccatacc aaacgtacca 240
 ttgagacact tgttgcaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292
 Met Phe Thr Gly Ser Ile Val
 1 5
 gcg att gtt act ccg atg gat gaa aaa ggt aat gtc tgt cggt gct agc 340
 Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser
 10 15 20
 ttg aaa aaa ctg att gat tat cat gtc gcc agc ggt act tcg gcg atc 388
 Leu Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile
 25 30 35
 gtt tct gtt ggc acc act ggc gag tcc gct acc tta aat cat gac gaa 436
 Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu
 40 45 50 55
 cat gct gat gtg gtg atg atg acg ctg gat ctg gct gat ggg cgc att 484
 His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile
 60 65 70
 ccg gta att gcc ggg acc ggc gct aac gct act gcg gaa gcc att agc 532
 Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser
 75 80 85
 ctg acg cag cgc ttc aat gac agt ggt atc gtc ggc tgc ctg acg gta 580
 Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val
 90 95 100
 acc cct tac tac aat cgt ccg tcg caa gaa ggt ttg tat cag cat ttc 628
 Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe
 105 110 115
 aaa gcc atc gct gag cat act gac ctg ccg caa att ctg tat aat gtg 676
 Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val
 120 125 130 135
 ccg tcc cgt act ggc tgc gat ctg ctc ccg gaa acg gtg ggc cgt ctg 724

Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu
 140 145 150
 gcg aaa gta aaa aat att atc gga atc aaa gag gca aca ggg aac tta 772
 Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu
 155 160 165
 acg cgt gta aac cag atc aaa gag ctg gtt tca gat gat ttt gtt ctg 820
 Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu
 170 175 180
 ctg agc ggc gat gat gcg agc gcg ctg gac ttc atg caa ttg ggc ggt 868
 Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly
 185 190 195
 cat ggg gtt att tcc gtt acg act aac gtc gca gcg cgt gat atg gcc 916
 His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala
 200 205 210 215
 cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt 964
 Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val
 220 225 230
 att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc 1012
 Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro
 235 240 245
 aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg 1060
 Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala
 250 255 260
 acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt 1108
 Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg
 265 270 275
 gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taa agt 1153
 Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu Ser
 280 285 290

ttaggagat ttgatggctt actctgttca aaagtgcgc ctgg 1197

<210> 14

<211> 292

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 14

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys

1 5 10 15

Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val

20 25 30

Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser

35 40 45

Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu

50 55 60

Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn

65 70 75 80

Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly

85 90 95

Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln

100 105 110

Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu

115 120 125

Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu

130 135 140

Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile

145 150 155 160

Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu

| | | |
|---|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
| Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu | | |
| 210 | 215 | 220 |
| His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Ala Gly Leu Leu | | |
| 290 | | |

【図面の簡単な説明】

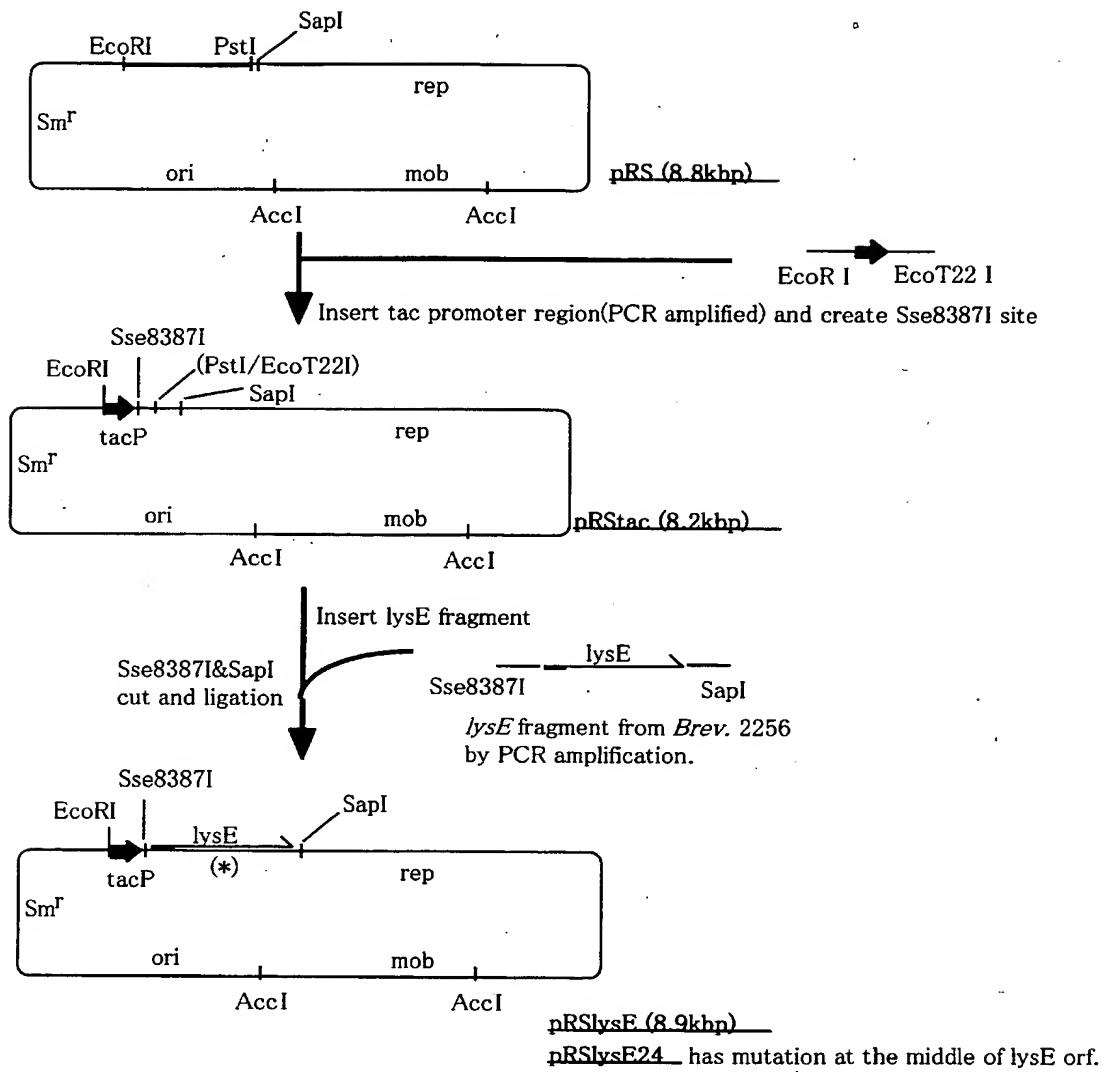
【図1】 tacプロモーターを持つプラスミドpRStac、及びpRStacにlysE遺伝子又はlysE24遺伝子が挿入されたプラスミドpRSlysE及びpRSlysE24の構築を示す図。

【図2】 lysE24遺伝子とdapA^{*}遺伝子を持つプラスミドpRSlysEdapAの構築を示す図。

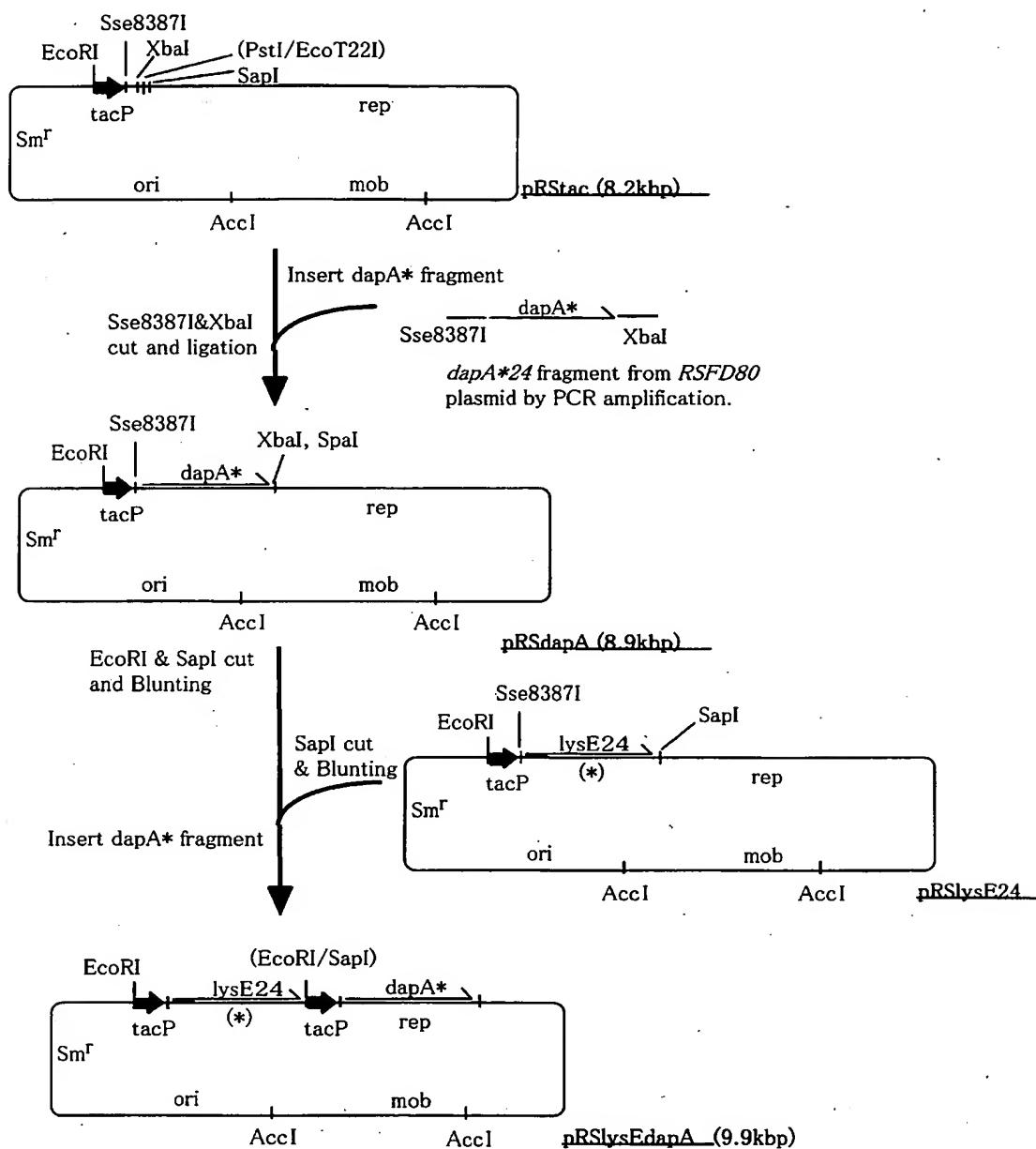
【書類名】

図面

【図 1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来知られている技術と異なる観点から、メタノール資化性細菌のL-アミノ酸生産性を向上させる技術を提供する。

【解決手段】 L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、L-アミノ酸を培地中に生成蓄積させ、該培地よりL-アミノ酸を採取する、L-アミノ酸の製造法において、前記微生物として、エントナー・ドウドロフ経路を有し、かつ、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性もしくは2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーーゼ活性、又はこれらの両方の活性が増強されたメタノール資化性細菌を用いる。

【選択図】 図1

特願2002-336346

出願人履歴情報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社
2. 変更年月日 2003年 5月 12日
[変更理由] 名称変更
住 所 住所変更
氏 名 東京都中央区京橋1丁目15番1号
味の素株式会社